

多元素同時追跡法による脳局所遷移金属の濃度分布 およびその生物無機化学の展開

著者	天野 良平
著者別表示	Amano Ryohei
雑誌名	平成16(2004)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2002-2004
ページ	9p.
発行年	2005-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049266

多元素同時追跡法による脳局所遷移金属の 濃度分布およびその生物無機化学の展開

(課題番号：14540512)

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成17年3月

金沢大学附属図書館



0500-04131-8

研究代表者 **天野 良平**

(金沢大学医学部保健学科)

はしがき

研究代表者は、理化学研究所との共同研究において15元素を越えるラジオアイソトープを一つの溶液に含むラジオアイソトープ(RI)・マルチトレーサー法を開発し、主として動物実験に適用し、第一遷移金属のV, Cr, Mn, Fe, Co, Zn やSeなどの微量金属の生体内動態を同時に知ることができることを明らかにした。さらに先行研究および本研究において、中性子放射化分析法およびICP-MS法を適用して脳内の各部位における数種の元素(とくに第一遷移金属のMn, Fe, Co, Zn)の量が高感度で決定することができることを示してきている。本研究においても一貫として、これら三法がもつ特色—原子核をプローブとして多元素を同時に追跡するという特色—を生かし研究を展開してきた。「マルチトレーサーで脳内の動きを！ICP-MSと放射化分析で脳内の量的な分配を！」を探ってきた。質の違うこれらの追跡データ情報は“脳局所の遷移金属濃度分布およびその生物無機化学”という新たな地平を与えると考える。

本研究において次の事実が明らかになった。

1. 脳内における遷移金属濃度は多くの場合、不均一に分布している。それは金属によって特異的であり、成長過程においても特殊性がある。
2. 脳内の鉄濃度は、加齢の過程において、特に顕著に局所に集積する。
3. パーキンソンモデルラットの実験によると、病態の発生とともに鉄が黒質に集積することが判明し、さらに先んじてマンガンの集積があると考えられる。
4. 3の結果は、パーキンソン疾病の発生に脳内微量元素が関与している可能性を示すものであり新たな事実である。
5. 血液脳関門は脳内の微量元素濃度の制御に大いに働いていると考えるのは大きな間違いではないと思われるが、我々はこの血液脳関門を経由しないで脳内に金属元素が侵入する新たな経路を明らかにした。それは鼻腔より嗅覚神経を通る経路である。
6. 鼻腔より嗅覚神経を通して、アルカリ金属およびタリウムが脳内に容易に入ることを実験的に示し、医学への応用に言及した。

研究組織

研究代表者	天野 良平(金沢大学・医学部・教授)
研究分担者	鷺山 幸信(金沢大学・医学部・助手)
研究分担者	榎本 秀一(理化学研究所・加速器基盤研究部・前任研究員)

交付決定額(配分額)

金額単位千円

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1,600	0	1,600
平成15年度	1,000	0	1,000
平成16年度	500	0	500
総 計	3,100	0	3,100

研究発表

印刷発表リスト

1. Tohru Tarohda, Yuko Yabushita, Yousuke Kanayama, Ryohei Amano and Shuichi Enomoto:
Brain regional uptake of trace elements in normal mice during development.
RIKEN Accelerator Progress Report 2001, vol. 35, p.110, 2002
2. Yuko Yabushita, Yousuke Kanayama, Tohru Tarohda, Ryohei Amano and Shuichi Enomoto:
Brain regional tracer uptake and elemental concentration in mice fed Zn-deficient and excessive diets.
RIKEN Accelerator Progress Report 2001, vol. 35, p.111, 2002.
3. Yousuke Kanayama, Yuko Yabushita, Ryohei Amano and Shuichi Enomoto:
Lateralization and sexual difference of trace elements in cerebral cortex of normal.
RIKEN Accelerator Progress Report 2001, vol. 35, p.113, 2002
4. Yousuke Kanayama, Takae Tuji, Ryohei Amano and Shuichi Enomoto:
Subcellular distribution of trace elements in mouse brain regions using multitracer technique.
RIKEN Accelerator Progress Report 2001, vol. 35, p.112, 2002
5. Takae Tuji, Akemi Kanbara, K. Ryohei Amano, Eriko Hirunuma and Shuichi Enomoto:
Trace element transfer from pregnant mice to the fetus.
RIKEN Accelerator Progress Report 2001, vol. 35, p.114, 2002
6. Yuko Yabushita, Yousuke Kanayama, Tohru Tarohda, Ryohei Amano, and Shuichi Enomoto :
Multitracer screening for *in vivo* element-element interrelations. Part I: Uptake of ^{54}Mn , ^{46}Sc , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{65}Zn , ^{75}Se , ^{83}Rb , ^{85}Sr and ^{88}Zr by brain and other organs of mice bred under Mn-deficient, -adequate and -excessive diets,
J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 253 (1), pp.93 -99, 2002
7. Ryohei Amano:
Multitracer -Feature, Preparation and Bio-application-. International Symposium on Transfer of Radionuclides in Biosphere,
"Proceedings of the International Symposium: Transfer of Radionuclides in Biosphere - Prediction and Assessment -" (Eds. H. Amano and S. Uchida), JAERI-Conf 2003-0010, pp.62-70, 2003
8. Yuko Yabushita, Yousuke Kanayama, Tohru Tarohda, Shuichi Enomoto, and Ryohei Amano:
Multitracer screening for *in vivo* element-element interrelations Part II: Uptake of ^{65}Zn , ^{46}Sc , ^{58}Co , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{83}Rb , ^{85}Sr and ^{88}Zr by brain and other organs of mice bred under Zn-deficient, -adequate and -excessive diets,
J. Radioanal. Nucl. Chem., vol.256 (3), pp.481-488, 2003
9. Yuko Yabushita, Yousuke Kanayama, Tohru Tarohda, Takae Tuji, Koshin Washiyama and

Ryohei Amano:

Brain regional distribution of the minor and trace elements, Na, K, Sc, Cr, Mn, Co, Zn and Se, in mice bred under Zn-deficient, -adequate and -excessive diets,
J. Radioanal. Nucl. Chem., vol.257 (2), pp.399-403, 2003

10. Takae Tsuji, Yuko Yabushita, Tohru Tarohda, Yousuke Kanayama, Koshin Washiyama and Ryohei Amano*:

Elemental concentration of manganese and potassium in brain and other organs of fetal, sucking and developmental mice.

J. Radioanal. Nucl. Chem., vol.258 (1), pp.49-53, 2003

11. Kohshin Washiyama, Ryohei Amano, Jun Sasaki, Seigo Kinuya, Norihisa Tonami, Yoshinobu Shiokawa and Toshiaki Mitsugashira:

²²⁷Th-EDTMP: A potential therapeutic agent for bone metastasis.

Nuclear Medicine and Biology, 31(7) pp901-908(2004).

12. Tohru Tarohda, Masayoshi Yamamoto, Ryohei Amano:

Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 380, pp2040-246(2004).

13. Yousuke Kanayama, Takae Tsuji, Shuichi Enomoto, Ryohei Amano:

Multitracer screening: Brain delivery of trace elements by eight different administration methods.

BioMetals, in press

14. Yousuke Kanayama, Shuichi Enomoto, Toshiaki Irie, Ryohei Amano:

Axonal Transport of Rubidium and Thallium in the Olfactory Nerve of Mice.

Nuclear Medicine and Biology, in press

口頭発表リスト

1. 天野良平:

脳における微量元素代謝と加齢の影響

理研シンポジウム「第6回 理研加速器による物性材料・原子物理・核物性・生物医学の研究」.

平成14年(2002)3月5日,理化学研究所(和光)

2. 辻孝枝、藪下裕子、金山洋介、蛭沼利江子、榎本秀一、天野良平:

乳仔期マウスにおけるマンガンおよびその他微量元素の挙動、

第13回日本微量元素学会、

平成14年7月4,5日, かずさアカデミアパーク(千葉県木更津), Biomed. Res. Trace Elements, vol.13, pp232-233, 2002

3. 天野良平、提嶋裕美、豊田佐和子、川井恵一、柏倉健一、藤林靖久:

脳内マンガン濃度とT1強調MRイメージングにおける信号強度との関係ーラットによる検討ー、

第回福井医科大学高エネルギー研究施設発表会、
平成14年7月12日、福井医科大学高エネルギー研究施設

4. (Poster Award) Takae Tsuji, Tohru Tarohda, Yousuke Kanayama, Shuichi Enomoto, Ryohei Amano:
ELEMENTAL CONCENTRATION AND TRACER UPTAKE DISTRIBUTION OF MANGANESE AND OTHER
ELEMENTS IN FETAL, SUCKLING AND DEVELOPMENTAL MICE,
THE Vth CONFERENCE of the INTERNATIONAL SOCIETY FOR TRACE ELEMENT RESEARCH IN
HUMANS (Hilton Québec Hotel, September 7-12, 2002)

5. 辻孝枝、蛭沼利江子、榎本秀一、天野良平:
脳内マンガン濃度および取込挙動:胎仔-乳仔-成長期マウスにおけるその変化、
2002日本放射化学会年会・第46回放射化学討論会、3A01,
平成14年9月23-25日、かでの2.7(札幌)Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences、3
(Supplemwnt),95(2002)

6. 鷺山幸信、天野良平、絹谷清剛、塩川佳伸:
壊変生成系列核種の生体内挙動、
2002日本放射化学会年会・第46回放射化学討論会、3A02,
平成14年9月23-25日、かでの2.7(札幌)Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences、3
(Supplemwnt),96(2002)

7. 太朗田融、藪下裕子、天野良平:
脳内亜鉛の局所分布測定を検討、
2002日本放射化学会年会・第46回放射化学討論会、3P44,
平成14年9月23-25日、かでの2.7(札幌)Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences、3
(Supplemwnt),160(2002)

8. 金山洋介、榎本秀一、天野良平:
RI投与法スクリーニング:マルチトレーサー法によるマウス脳へのRI輸送挙動、
2002日本放射化学会年会・第46回放射化学討論会、3P46,
平成14年9月23-25日、かでの2.7(札幌)Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences、3
(Supplemwnt),162(2000)

9. Takae Tsuji, Rieko Hirunuma, Shuichi Enomoto and Ryohei Amano:
ELEMENTAL CONCENTRATION AND TRACER UPTAKE BEHAVIOR OF MANGANESE IN FETAL,
SUCKLING, AND DEVELOPMENTAL MICE,
International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (BITREL2002) -Joint Symposium of RIKEN and
Yamanashi Institute of Environmental Sciences, Wako & Fujiyoshida, October 28- November 2, 2002

10. (Poster Award) Yousuke Kanayama and Ryohei Amano:
OLFACTORY TRANSPORT OF RUBIDIUM BY INTRANASAL ADMINISTRATION METHOD,
International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (BITREL2002) -Joint Symposium of RIKEN and
Yamanashi Institute of Environmental Sciences, Wako & Fujiyoshida, October 28- November 2, 2002

11.Kohshin Washiyama, Ryohei Amano, Seigo Kinuya and Yoshinobu Shiokawa:

BIODISTRIBUTION OF RA-225 AND THEIR DAUGHTER NUCLIDES IN NEPTUNIUM SERIES,
International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (BITREL2002) -Joint Symposium of RIKEN and
Yamanashi Institute of Environmental Sciences, Wako & Fujiyoshida, October 28- November 2, 2002

12.天野良平:

「マルチトレーサーからのserendipity:嗅覚輸送の視覚化」

理研シンポジウム「第6回 理研加速器による物性材料・原子物理・核物性・生物医学の研究」

平成15年(2003)2月28日,理化学研究所(和光)

13.Ryohei Amano:

Multitracer -Feature, Preparation and Bio-application-

International Symposium on Transfer of Radonuclides in Biosphere, Mito (Ibaraki), 18-19 December 2002.

14 大野真里、天野良平、榎本秀一:

「マルチトレーサースクリーニング:鼻腔を経由して直接脳に移行する元素群の探査」、

第5回環境放射能研究会、平成16年3月2-4日、高エネルギー加速器研究機構放射線科学センター(つくば)

14.天野良平:

「マルチトレーサーからのセレンディピティ」、第65回応用物理学会学術講演会シンポジウム「放射線の生物・医科学への応用の進展」、

平成16年9月2日、東北学院大学(仙台)

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし。

研究成果

研究代表者は「マルチトレーサーとは多種の放射性核種を一緒に含む一溶液」と定義し、これを利用することにより「色々な系で、多くの元素の挙動を同時にトレース(追跡)することができる」と考え、実験を通してマルチトレーサーの医学・生物学利用について議論し続けている。本研究においてもこれを手段に展開した。マルチトレーサーの特徴を考えると、①広い範囲の元素をカバーしている、②無担体として存在する、③1回の実験で多くの元素についての情報を得る、④同一条件下で比較でき正確である、⑤セレンディピティが期待される、の5点と考えている。1回の実験で多くの元素の情報を得るという特徴③は、マルチトレーサーのセールスポイントである。例えば動物にマルチトレーサー投与して3時系列後の各組織における微量元素の分配をマルチトレーサーを使って11トレーサーの追跡を検討するとする。各経過時間において個体差によるバラツキについて統計のために $n=4$ 匹で行うとすると $4 \times 3 = 12$ 匹の動物を使うことになる。一方もし単一トレーサーでこれらと同程度の結果を得ることを目的とするならば11トレーサーを使用することになり、動物は $12 \times 11 = 132$ 匹を必要となる。実験動物をできるだけ減らす立場からも利点がある。さらに我々がよく動物実験で経験することであるが、動

物個体グループが同系であり実験環境がまったく同じでないと(動物実験でこれを実現するのは意外と難しい)得られた結果を同じ図表の中で比較しにくい。しかしマルチトレーサーではこの点が解消される。同一個体の中でのトレーサーを追いかけているのであるから、相互比較は正確である(特徴④)。マルチトレーサーにはセレンディピティがある。通常、実験はもちろん解決すべき課題をもって計画され実行される、目的トレーサーの挙動を追跡的を絞った議論がなされる。しかし多くの場合、研究対象は複雑であり、結果の解釈の際には周辺の種々のデータがほしいと思うことが度々ある。また当初の目標どおりにはいかないが、別の重要な側面が見えてくる場合がある。結果として解決すべき課題に早く近づけ新展開へと発展することがある。マルチトレーサーを使ってみるとこのような予期しなかった発見がある(特徴⑤)。マルチトレーサーがどういった領域に応用可能か、マルチトレーサーで何が分かるのかについて触れたい。応用領域は、どのような系であれ元素の挙動を研究するというテーマであればその適用範囲であると考えられる。しかしマルチトレーサー利用における現状での最大の欠点は、核種分析に必要な γ 線スペクトルが Ge 半導体検出器により行うことが必要で、検出効率が低いいため1試料の測定に時間がかかることであると思う。通常、医学・生物学試料における1回の実験における試料数は100を超えることが多いので、全試料を測定するのに数日を要する。測定-解析-計画-測定のサイクルの早い研究においては、この点を解決しなければ研究が停滞してしまう。著者はこのような現状におけるマルチトレーサー法の意義は「マルチトレーサーは対象とする系での元素の動態のスクリーニング法として便利であり全体像を把握するのに威力を発揮する」(私はこれをマルチトレーサースクリーニングと呼んでいる)ことにあると思う。対象元素が決まったら単一トレーサーを使い、研究を展開するのが良いと思っている。ある研究のスタートに、また研究が行き詰まったときに、マルチトレーサーの利用を考えてみる価値はある。研究代表者は、このような背景のもとマルチトレーサー研究を行った。

本研究課題では、神経路による物質輸送の研究に大きなブレークスルーをもたらした。マルチトレーサースクリーニングが与えてくれたセレンディピティに端を発している。投与方法の違いによる脳への元素移動のマルチトレーサースクリーニングを行ってきた。即ち、成獣雄マウス($n=3$)にマルチトレーサー溶液を、静脈投与、腹腔投与、鼻孔投与、筋肉投与、皮下投与、皮中投与、経皮投与および経口投与の8投与方法にて投与し、数分、3、24時間後血液、脳(嗅球を除く)を摘出し、 γ 線スペクトル測定を行い、血液、脳における取込み率(%dose/g)を評価した。マルチトレーサーにより ^{46}Sc , ^{48}V , ^{54}Mn , ^{59}Fe , ^{58}Co , ^{65}Zn , ^{74}As , ^{75}Se , ^{83}Rb , ^{85}Sr , ^{88}Zr および $^{95\text{m}}\text{Tc}$ が同時に追跡でき、その結果により微量元素の血液クリアランスおよび脳への移行が議論された。その中で鼻孔投与による ^{83}Rb の脳取込み率に不思議さが見られた。鼻孔投与 ^{83}Rb 脳取込み率は、他の7方法よるものよりも高く、24時間後においては2倍量に達することが判った。鼻腔の経路には他の投与経路にはない経路があるように思える。直接に嗅覚神経を経由した Rb の脳移行経路があると考えに至った。

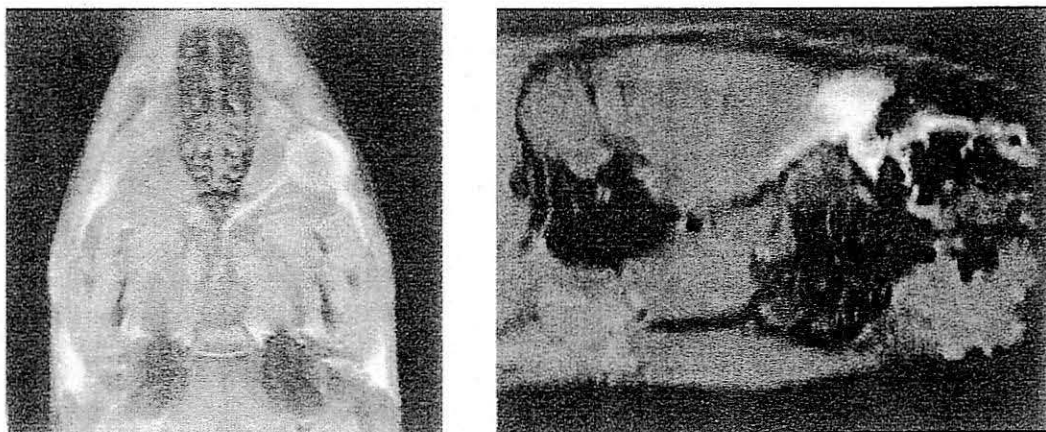
鼻孔投与の Rb が嗅神経を経由して輸送されることを確認するために、単一トレーサー ^{86}Rb を使って詳細に検討した。 $^{86}\text{RbCl}$ を片側鼻孔に投与した後、種々の経過時間における左右の篩骨篩板および脳の7部位におけるトレーサーの滞留と取込みを、静脈投与のそれと比較した結果、投与後24時間以内において両投与方法における脳各部位での取込み率は全く異なっており、鼻孔投与により投与側の嗅球および前脳で反対側に比べて明らかに高い取込みを示した。投与後3から12時間において投与側嗅球での ^{86}Rb 取組みは反対側の3倍から5倍あり、同時間での静脈投与後の取込み率に比べて30倍から60倍であることが判った。12時間を過ぎると次第に両投与方法の違いは少なくなっていくことが判った。我々は鼻孔投与により投与量に1%程度の ^{86}Rb が鼻腔から脳に血液脳関門を経由しないで直接移行することが確認された²³⁾。

現在、我々は嗅神経より実験系が組みやすい視神経に注目し「神経路を経由する物質輸送の研究」を展開している。視神経は網膜にある神経節細胞の軸索が集まったものであり、眼球を出た後、視

交叉において交差し、視索を通過して外側膝状体、上丘、視蓋前野に投影されている。マルチトレーサースクリーニングによってこれに迫った。 ^{54}Mn 、 ^{83}Rb 、 ^{65}Zn の 3 トレーサーにおいて、視神経、視索、大脳皮質における移行・滞留が観測され、軸索輸送される可能性が強く示唆された。嗅神経で経験のある ^{83}Rb については、眼球、視神経、視索において滞留時間が短く、速い速度で視神経、視索を通過していることが判った。 ^{54}Mn は視神経、視索での取込率が投与後 12 から 48 時間後においても高く、遅い速度で軸索輸送されていると考えられる。その移行は緩慢であり ^{54}Mn は長い時間継続的に脳内を移行していることを示している。 ^{65}Zn は眼球から視神経、視索への移行がさらに遅いと考えられた。3 トレーサーの視神経における移行速度は $^{83}\text{Rb} > ^{54}\text{Mn} > ^{65}\text{Zn}$ の順で速いと考えられた。この結果はマルチトレーサースクリーニングだからこそ得られた成果である。この結果からまた新たな展開が始まる。

我々も Mn の軸索輸送を検討することとなった。我々は、この課題について単一トレーサー ^{54}Mn による検討と微量 Mn を利用する MRI の検討を開始している。いずれの時間においても尾静脈投与では均一な弱い放射能の分布しか確認されなかったが、眼球投与では局在した強い放射能の分布が観測された。眼球投与 12、24、48 時間後においては視神経や視交叉、視索、視覚神経路の投射先である上丘、外側膝状体に限局した Mn の分布が観測された。しかし、7 日後では投与後早い時間では観測されなかった大脳皮質でも分布が観測された。この大脳皮質の分布は、視覚野の存在する後頭部に前頭部よりも強い放射能が観測された。いずれの時間においても、投与側の反対側において強い放射能が観測された。投与後 48 時間暗室飼育した場合でも、放射能の分布は通常飼育した場合と変化はなかった。このような反対側に優位な ^{54}Mn の放射能の分布は、アルビノラットの視交叉における視神経の交差の比が、等分でなく交差分が多いという事実を反映していると考えられた。また、投与後 7 日で左右差を保ったまま 1 次視覚野の存在する後頭部の大脳皮質が前頭部よりも優位な放射能の分布を示すことから、Mn はシナプスをこえて輸送がされていると考えられた。

眼球投与および鼻孔投与された Mn の脳への直接輸送の描出は Mn 強調 MRI 法においても下図のように観測された。Mn の医療応用の将来性を示唆するものである。



MPR images from T1-weighted MRI set in which the rat had Mn^{2+} injected into the eye (A) and the naris (B).

これらの成果の一部は、次の発表論文に記した。以下に、論文名とページを示す。

1. Multitracer screening for <i>in vivo</i> element-element interrelations. Part I: Uptake of ⁵⁴ Mn, ⁴⁸ Sc, ⁵⁸ Co, ⁵⁹ Fe, ⁶⁵ Zn, ⁷⁵ Se, ⁸³ Rb, ⁸⁵ Sr and ⁸⁸ Zr by brain and other organs of mice bred under Mn-deficient, -adequate and -excessive diets	9
2. Multitracer screening for <i>in vivo</i> element-element interrelations Part II: Uptake of ⁶⁵ Zn, ⁴⁸ Sc, ⁵⁸ Co, ⁵⁴ Mn, ⁷⁵ Se, ⁸³ Rb, ⁸⁵ Sr and ⁸⁸ Zr by brain and other organs of mice bred under Zn-deficient, -adequate and -excessive diets	17
3. Brain regional distribution of the minor and trace elements, Na, K, Sc, Cr, Mn, Co, Zn and Se, in mice bred under Zn-deficient, -adequate and -excessive diets	25
4. Elemental concentration of manganese and potassium in brain and other organs of fetal, sucking and developmental mice	31
5. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development	37
6. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rats	61
7. Multitracer screening: Brain delivery of trace elements by eight different administration methods.	85
8. Axonal Transport of Rubidium and Thallium in the Olfactory Nerve of Mice	109

各論文における個別の成果は、上記論文の本文を参考にしてほしい。

今後、脳局所の遷移金属濃度分布およびその生物無機化学は脳研究の基盤研究として重要になってくる。その時、本科学研究成果が参照されると確信している。